






# 15

**LIPOSOME EXTRUSION PROCESS****Publication number:** JP6501646T**Publication date:** 1994-02-24**Inventor:****Applicant:****Classification:****- international:** A61K9/127; B01J13/02; A61K9/127; B01J13/02; (IPC1-7): B01J13/02; A61K9/127**- European:** A61K9/127P**Application number:** JP19910518543T 19911004**Priority number(s):** WO1991US07272 19911004; US19900593200 19901005**Also published as:** WO9205772 (A1)  
 EP0552299 (A1)  
 IE913494 (A1)  
 FI931512 (A)  
 EP0552299 (A4)

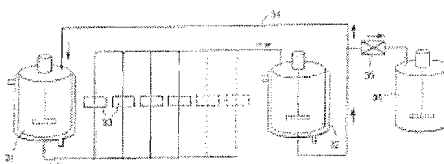
more &gt;&gt;

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP6501646T

Abstract of corresponding document: **WO9205772**

A method of sizing liposomes by passing a suspension of liposomes through an aluminum oxide porous film under pressure is disclosed. In a preferred embodiment, the porous film is a branched type anodic aluminum oxide porous film. The process produces a population of liposomes substantially free of liposomes above a pre-determined maximum size useful in administering drugs or other bioactive agents, such as in the treatment of cancer or AIDS-related illnesses. Also disclosed for carrying out the method is an apparatus comprising one or more filter assemblies for holding the aluminum oxide porous film in operational configuration (33), a pressurized supply vessel for supplying the suspension of liposomes under pressure to filter assemblies (31), and a receiving vessel for receiving the filtrate from the filter assemblies (32).

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-501646

第2部第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)2月24日

(51) Int.Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

B 0 1 J 13/02

A 6 1 K 9/127

C 7329-4C

6345-4G

B 0 1 J 13/02

Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平3-518543  
 (86) (22) 出願日 平成3年(1991)10月4日  
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1992)4月2日  
 (84) 国際出願番号 PCT/US91/07272  
 (87) 国際公開番号 WO92/05772  
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)4月16日  
 (31) 優先権主張番号 593, 200  
 (32) 優先日 1990年10月5日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, S E), AU, CA, FI, JP

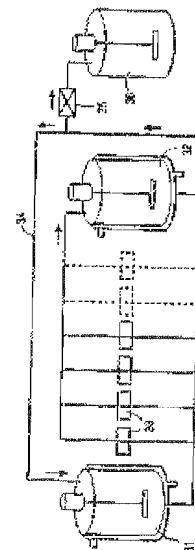
(71) 出願人 ザ リボソーム カンパニー, インコーポ  
 レイテッド  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州  
 08540 プリンストン プリンストンフォ  
 レスタルセンター リサーチウェイ 1  
 (72) 発明者 コエ, ロイデン, エム  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州  
 08505 ボーデンタ ウン ハノーバーコ  
 ート 17  
 (74) 代理人 弁理士 大多和 明敏 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リボソーム押出法

(57) 【要約】

リボソームの懸濁液を、加圧下で酸化アルミニウム多孔性フィルムに通すことによる、リボソームのサイジング方法が記載されている。好ましい実施態様においては、多孔性フィルムが、分岐型陽極酸化アルミニウム多孔性フィルムである。この方法は、傷又はエイズ関連疾病の治療におけるように、薬剤又は他の生体活性剤を投与するのに有用である、所定の最大粒径よりも大きいリボソームを実質的に含まないリボソーム集団を製造する。この方法を実施する装置であって、酸化アルミニウム多孔性フィルムを操作配管に保持する一つ以上のフィルター集成装置 (33)、リボソームの懸濁液を加圧下にフィルター集成装置へ供給する加圧供給容器 (31) 及びフィルター集成装置から懸液を受容する受容容器 (32) を含有する装置も記載されている。



### 請求の範囲

1. 所定の最大粒径よりも大きいリボソームを実質的に含まないリボソーム集団を製造する方法において、

(A) 一部の粒径が該所定の最大粒径よりも大きいリボソームの懸濁液を用意すること、及び

(B) この懸濁液を、減圧下に1回以上、酸化アルミニウム多孔性フィルムに通過させること、  
からなる方法。

2. 酸化アルミニウム多孔性フィルムが、約200nm以下の細孔サイズを有している、所定の最大粒径が約500nmよりも大きいリボソーム集団を製造する請求の範囲1記載の方法。

3. 懸濁液を多孔性フィルムに2〜10回通す請求の範囲1記載の方法。

4. 懸濁液を約0.01psi(4.2kPa)よりも小さい圧力で該フィルムに通す請求の範囲1記載の方法。

5. 多孔性フィルムが、分岐細孔型薄膜酸化アルミニウム多孔性フィルムである請求の範囲1記載の方法。

6. 分岐細孔型薄膜酸化アルミニウム多孔性フィルムが、約200nm以下の細孔サイズを有している、所定の最大粒径が約500nmよりも小さいリボソーム集団を製造する請求の範囲1記載の方法。

7. リボソーム集団が、約100〜約200nmの平均粒径を持つようになるまで、リボソームの懸濁液を多孔性フィルムに1回以上通す請求の範囲1記載の方法。

8. 該細孔サイズが約100nmである請求の範囲1記載の方法。

膜プレサイジングが、約2〜10マイクロメートルの範囲内の細孔サイズを有するフィルターにリボソームの懸濁液を1回以上通すことを含む、請求の範囲1記載の方法。

17. (A) 酸化アルミニウム多孔性フィルムを操作し得る装置に保持する一つ以上のフィルター保持装置、

(B) リボソームの懸濁液を該装置にフィルター保持装置へ供給する加圧供給手段

(C) 該フィルター保持装置から懸液を回収する受容容器

を含む、請求の範囲1記載の方法を実施するための装置。

18. 該フィルター保持装置が、該供給手段と該受容手段との間の操作に平行な流れのために、該装置内で配列されている、二つ以上の該フィルター保持装置を含む請求の範囲17記載の装置。

19. 濾液を該装置手段から該供給手段へ再循環させる再循環手段を更に含む請求の範囲17記載の装置。

### 特表平6-501646(2)

9. 懸濁液を多孔性フィルムに2〜10回通す請求の範囲1記載の方法。

10. 懸濁液を約0.01psi(4.2kPa)よりも小さい圧力でフィルムに通す請求の範囲1記載の方法。

11. 分岐細孔型薄膜酸化アルミニウム多孔性フィルムが、

二つの実質的に平行な主軸を有し、細孔がシートの一つの面から他の面に伸長している酸化アルミニウムシートからなり、

一つの面からシート内へ延びる大きな細孔の系と、他の面から内側へ伸びる小さな細孔の系を含み、

一つ以上の小さな細孔の内側端部が一つの大い細孔の内側端部と結合し、大い細孔が実質的に直になつていないように、大い細孔の系が、小さな細孔の系と連続している、

請求の範囲1記載の方法。

12. 該多孔性フィルムの小さな細孔が、約200nm以下の実質的に均一な最小直径を有する、所定の最大粒径が約500nmよりも小さいリボソーム集団を製造する請求の範囲1記載の方法。

13. 小さな細孔の壁厚が約100nm以下である請求の範囲12記載の方法。

14. リボソーム集団が、約100〜約200nmの平均粒径を持つようになるまで、リボソームの懸濁液を多孔性フィルムに1回以上通す請求の範囲13記載の方法。

15. リボソームの懸濁液を多孔性フィルムに2〜10回通す請求の範囲14記載の方法。

16. リボソームの懸濁液を該多孔性フィルムに通す工程の前に、リボソームをプレサイズ(予選分粒)することを含む、

### 明細書

#### リボソーム抽出法

本発明は、リボソームのサイジング(分粒)方法に関するものであり、更に詳しくは、分岐細孔型酸化アルミニウム多孔性フィルムからリボソームを押し出すことを含むサイジング方法に関するものである。

リボソームは、取り込まれた有機物を全て完全に閉鎖された脂質二分子膜である。リボソームは、革ラメラ小胞(3種の二分子膜を有する)であっても、多量ラメラ小胞(複数の脂質二分子膜が、それぞれ隣接する膜から水腔層により分離されていることを特徴とする玉層状構造)であってもよい。二分子膜は、親水性“尾”領域と親水性“頭”領域とを有する2つの脂質分子膜で構成されている。脂質二分子膜の構造は、脂質分子膜の親水性(非極性)“尾”が二分子膜の中心に隣り合って内向し、一方、親水性“頭”が水腔層に向かって配向するようになっている。

Banghan 等 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 11, 238-262 (1965))の初期のリボソーム精製法では、リン脂質を有機溶剤中に懸濁させ、次いでそれを蒸気浴蒸して、度々容器上にリン脂質フィルムを凝縮させる。次いで、適量の水性相を加えて、混合物を“煮沸”させ、多量ラメラ小胞 (MLV's) からなる生成リボソームを無機的手段により分粒させる。この技術は、大量ラメラ小胞 (LUV's) と同様に、Papadogiorgakis 等 (バイオフィジカ・バイオフィジカ・エト・アクタ (Biochim. Biophys. Acta), 135, 624-636 (1986)) が

特表平6-501646 (3)

述べている音波処理した小腸ラメラ小胞 (SUV) の調製の新規を提供している。更に、1989年11月25日に *Parshad et al.* 等が発行された米国特許第4, 539, 371号は、造粒脂小胞 (RBLVs) としても知られているオリゴラメラ脂質小胞を作る“造粒脂小胞”について述べている。

例えば、脂質成分の流動性及び膜硬度が高く、安定性が良好であり、漏れが少なく、製造が容易であるといったような、特に改善された特徴を有していることがわかっている改良された多量ラメラ小胞を形成するために、別の方法が開発されている。このような改良された一つのリボソームは、安易製ラメラ小胞 (SPLVs) と呼ばれ、1985年6月11日に発明された Lask 等の米国特許第4, 522, 813号に記載されている。このような改良された他のものは、脂質小胞 (MLVs) と記載され、1989年3月2日に発行された Fountain 等の米国特許第4, 598, 578号に記載されている。これらのリボソームは、均質とち、実質的に等しい厚膜 (ラメラ間) 脂質分岐を有しているといわれている。従って本特許を要する、種々のリボソーム製造方法の概略と、参考のためにここに引用した、H. Oster 編、リボソーム (1983)、27~51頁、Deamer 及び Uster の“リボソームの製造：方法と機構”に記載されている。各種の採用製造法において、造粒脂小胞の形状と組成を合わせて、あるいはそれに代わるものとして使用するために、リボソーム内にカプセル化されるか、若しくはリボソームと結合した薬剤を投与することが提議されている。いくつかの適用において、リボソームは、長期間にわたって、薬剤を持続放出することが見出されており、これは、種々の影響の慢又はエイズ関連病の治療にしばしば要求され

る長期間の化学療法療法に於いて、特に重要であることができる。リボソームのもう一つの性質は、食料題のような特定の細胞により取り込まれる能力であり、従って、リボソームは、その脂質成分を細胞の内部に輸送することができる。このことは、ミコプラズマ、ブルセラ、リステリア及びヘルペスウイルスと関連する感染のような細胞内感染を治療する際に、このようなリボソーム治療を特に有用なものである。このように、リボソーム内にカプセル化された薬剤を、多量の遊離非カプセル化薬剤を血液中に投与することなく、このような細胞内感染の治療のために投与することができる。更に、ある特定の薬剤又は他の生理活性剤を単にリボソームと結合させるだけで、かかる薬剤又は生理活性剤の毒性を高める若しくは減低し、あるいはそれらの毒性を減低させることが見出されている。

リボソームは、粒子のごとく崩壊し、一般に、平均粒径及び粒径分布により区別される。リボソームのある特定の用途では、特に薬剤の投与口役における使用では、特に、実質的に全てのリボソームが、所定の最大粒径よりも小さい粒径となるように、リボソームをサイジングすることにより、リボソームを目的とするターゲットにサイジングし、前記された粒径分布を確保することが重要である。典型的な投与を目的とするリボソームについては、一つの望ましい粒径範囲は、約100nmと1000nmの間であり、好ましくは約100nmと600nmの間である(ここで用いる場合、nmはナノメートル(10<sup>-9</sup>m)を表わし、umはマイクロメートル(10<sup>-6</sup>m)を表わす)。一般に、約200nmの粒径を識別する従来の膜フィルターで通過することにより、リボソームを濾過する必要があるときは、最大目的粒径がしばし

け制限される。しかし、主要な生物学的形態 (overriding biological efficiency) 及び/又は安全諸般により、大きいか、または小さいといった、特定の粒径の必要を示すことができる。リボソームの粒径範囲を制御することにより、リボソームの親水性及び親油性と共に、生体内リボソームの有効性を改良することができる。

種々のリボソーム製造法により、一般に、粒径が粒径範囲に要するリボソームの製造法が得られ、その多くは、平均粒径が1000nmを超える。このような製造法の中のリボソームの粒径及び粒径分布を減低させるために、多くの方法が提議されている。簡単な物質化方法においては、リボソーム粒子の目的とする平均粒径が得られるまで、脱脂す。リボソームの脂質膜を小さいオリフィス又は反応室を通して、絞り出し、ポンプで送る。この方法の利点は、リボソーム粒径分布が、典型的に非常に広く、均質化サイクル数、圧力及び内径温度によって変動することである。

粒径が100nmより小さいと、一般にいわれる小腸ラメラ小胞 (SUVs) は高圧にのみみ、両面した二分子膜で構成されている。SUVsは、典型的には、より大なるリボソームを脂質被膜で被覆することにより製造される。このようなリボソームの微粒子分布は、リボソームが、その最も小さい粒径、約100nm未満、にされたときに、連続されることであるだけであることがわかっている。更に、この方法は、一般に、比較的少量の長時間作製処理で、バッチ法として行われるために、大規模生産には向かないから知られない。更に、連続作製中の脂質被膜が、脂質に過酸化の損傷をもち、製剤処理プロセスが、潜在的に

生体内でまったく層層であるおそれのあるチタン粒子を散逸するかも知れない。

200nmのユニボア (Unibora) (商標) カーボネートフィルターでの通過によるリボソームのサイジング方法は、Stoks, プロシージングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*), **75**, 4184-8 (1978) で提議されている。約1000nmから約100nmまでの一連の均一な連続状態細胞膜ポリカーボネート膜からのリボソーム押出に基づくサイジング製造法は、Hunt 等、米国特許第4, 529, 369号、1989年7月18日発行、に記載されている。しかし、この方法は、比較的遅く、目的とする粒径分布を得るには、種々のサイズのフィルターに多数通過が必要であることが多い。

小胞は、ここに参考のために引用している Callia 等、米国特許第4, 608, 050号、1987年4月15日発行、に記載されている押出法を用いて粉砕してもよい。この技術により得られる小胞は、100nm以下の細孔サイズを有するフィルターから脂質下に押し出される。この方法は、上記酸化及び音波処理方法の両面を回避し、上に引用された米国特許第4, 529, 369号に記載されたように、サイズの小さなフィルターに何層も通す必要はない。このような方法は、特に、この特徴を選択されたサイズのフィルターに数層通過させることにより、まったく狭いリボソームの粒径分布を与えることができる。更に、このような押出により、多量ラメラ小胞がオリゴラメラ又はラメラ形態に変え変わるかも知れないし、それが有用な用途には必要とされるかも知れないと信じられている。しかし、本明細書において

## 特許平6-501646 (4)

以下に述べる実施例により示されるように、この特許実施例で用いられるヌクレオア (Nucleopore) (商標) フィルターのような、100 nm のポリカーボネートフィルターからかかる押出が行なわれる場合は、比較的高い圧力でも、装置は比較的使いかられない。

1988年4月12日に発行された米国特許第4,927,637号は、溶射セラミックフィルターからの押出によるリボソームのサイジング方法を記載している。このようなフィルターは、比較的薄い圧力で作動するように設計されており、詰まりを防ぐために、逆洗法 (バックフラッシュ) されることができる。1990年5月23日に発行された米国特許第4,927,637号は、リボソームの“蛇行路 (serpentine-path)”形成を有するポリマーフィルターにリボソームを通すことによるリボソームのサイジング方法を記載している。

別のタイプのフィルター媒体が、Furneaux 等、米国特許第4,987,581号、1992年3月18日発行、に記載されている。この特許は、フィルターの一面から他の面に分岐細孔が延在している陽極酸化アルミニウム (anodic aluminum oxide) フィルターを含む、新しいタイプのフィルターシートを開示している。このフィルターは、一面の面から内面へ伸びるより大きい細孔の系と、他の面から内面へ伸びるより小さい細孔の系を有するという点に特徴がある。一つ以上のより小さい細孔の内径端部が一つより大きい細孔の内径端部と結合し、より大きい細孔が実質的に面になっていないように、より大きい細孔の系が、より小さい細孔の系と連結している。この特許は、このような分岐細孔型酸化アルミニウム多孔性フィルム及びその形成方法を開示する目的で、

本明細書に参考のために引用されている。

特定の装置構成において、Furneaux 等の特許の分岐細孔陽極酸化アルミニウムフィルムは、次のように記載されている。

一つの前からある前層だけフィルムの中へ延び、内側表面近傍において孔径がより大きい細孔の系と、他の面から延在させるだけフィルムの中へ延び、実質的に均一な最小直径  $d$  を有するより小さい細孔の系とを有し、

一つ又はそれ以上のより小さい細孔の内径端部が一つより大きい細孔の内径端部と結合し、より大きい細孔が実質的に面になっていないように、より大きい細孔の系が、より小さい細孔の系と連結しており、

$d$  は10 nm ～ 2  $\mu$ m、

$p$  は少なくとも2 nm であるが0、5  $\mu$ m 未満、

$s$  は10 nm ～ 1  $\mu$ m である。

フィルムの一面の面から他の面に伸びている細孔を有する陽極酸化アルミニウムフィルム。

このような分岐細孔型フィルムのサイズ等級は、より小さい細孔の実質的に均一な最小直径  $d$  に等しい。

Furneaux 等の特許の記載に従って作られた製造例は、取られており、Anotec Separations, New York, NY により、アノボア (Anopore) (商標) の名称で販売されている。このような分岐細孔型膜に関する追加の情報が、Furneaux 等、“陽極酸化されたアルミニウムからの多孔性の陽極酸化された膜の形成”、ネイチャー (Nature), 322, 147-9 (1988) に提供されている。

このような分岐細孔アノボア (商標) フィルターの使用が、Jones 等、“バクテリアの濃縮計数に関する、トラックエッチング

法 (track-etched) ポリカーボネート膜フィルター (ヌクレオア) との新しい食菌膜フィルター (アノボア) の比較”、Applied and Environmental Microbiology, 53(2), 529-30 (1988)、に記載されている。この論文は、細孔サイズが200 nm のアノボア (商標) フィルターのバクテリア透過性を、細孔サイズが200 nm のヌクレオア (Nucleopore) (商標) フィルターと比較している。

本発明の方法によれば、(1) 一部の細孔が所定の最大径より大きいリボソームの懸濁液を通過し、(2) この懸濁液を、加圧下に1面以上酸化アルミニウム多孔性フィルムに透過させることにより、所定の最大径より大きいリボソームを実質的に含まないリボソーム集団 (population) が製造される。

約100～1000 nm の範囲内の平均直径を有するリボソームを得るために、1000 nm 以下の細孔サイズを有するフィルムを用いることができる。本発明の特定の実施態様においては、所定の最大直径が約500 nm 未満であるリボソーム集団をふるため、200 nm 以下の細孔サイズ等級を有するフィルムを用いる。他の実施態様においては、約100 nm 以下の細孔サイズを有するフィルムを使用し、平均リボソーム径が約100～200 nm となるまで、リボソーム懸濁液を1個以上フィルターに通す。

本発明の異なる実施態様においては、目的とする粒分布が得られるまで、リボソーム懸濁液を多孔性フィルムに繰り返し通す。特定の製造態様では、リボソームを多孔性フィルムに2～10回通す。更に別の製造態様においては、2～10マイクロメートルのフィルターに1回以上通すことにより、リボソームをプレサイ

ズ (precise) する。本発明で使用するために好ましいフィルムは、分岐細孔型陽極酸化アルミニウム多孔性フィルムである。上で論じたように、このような分岐細孔型陽極酸化アルミニウム多孔性フィルムは、二つの実質的に平行な表面を有し、細孔がシートの一つの面から他の面に伸びて存在しており、一面の面からシート内へ伸びるより大きい細孔の系と、他の面から内面へ伸びるより小さい細孔の系を有し、一つ以上のより小さい細孔の内径端部が一つより大きい細孔の内径端部と結合し、より大きい細孔が実質的に面になっていないように、より大きい細孔の系が、より小さい細孔の系と連結している酸化アルミニウムシートである。このような分岐細孔型フィルムのサイズ等級は、小さい方の細孔の最小直径に等しく、その細孔は、実質的に均一であることが好ましい。

本発明の異なる実施態様においては、この製造方法を無菌状態で実施される。この制度は、酸化アルミニウム多孔性フィルムを無菌状態に保持する一つ以上のフィルター無菌装置 (アセンブリ)、リボソーム懸濁液をそのフィルター無菌装置へ供給する手段、及びその無菌装置から濾液を回収する手段を含む。特定の装置態様では、二つ以上の無菌装置を平行配置で利用して、供給手段から受容手段へ濾液するリボソーム懸濁液を通過する。濾液の少なくとも一部を再循環させて、受容手段から供給手段へ戻す手段を任意に設けることもでき、かくして、リボソームをフィルターに多数回通すのに資する。更に、受容手段の下流に、濾液フィルターを設けることができ、それらは既製の濾液を調整するのに適当であるかもしれない。

押出は、速くで実施であり、除去されなければならない溶媒や他の薬品の使用を必要としない。

## 特表平6-501646 (5)

図1は、本発明により作られたフィルター形成装置の、概尺に示さない概略的な平面図である。

図2は、図1におけるフィルター形成装置の、図2-2による、概尺に示さない簡略化した縦断図である。

図3は、本発明により作られた押出機の概略図である。

上記 Farnham 等の大説で論じられているように、酸の中でアルミニウムを溶解化して、フィルムの一つの面の大きい細孔サイズ開口からフィルムの他の面の小さい細孔サイズ開口へ分岐していることが好ましい内面状細孔を有するセル又は開口の均一な配列を作ることが出来る。このようなフィルターは、電々の細孔サイズで入手することができ、リボソームの最終用途に応じて、より小さい又はより大きい細孔サイズを指定することが出来るが、本発明で使用するには、小さい方の細孔の細孔サイズが約1000nm未満であるものが好ましい（以下、特に断わらない限り、このようなフィルターに関する“細孔サイズ”は、小さい方の細孔の最小細孔サイズを意味するものとする）。現在、Sangre Separations 社から市販されているアノポア（商標）酸化アルミニウム多孔性フィルムのうち、細孔サイズが200nm未満であるものは、分岐細孔構造のものであり、細孔サイズが200nm以上であるものは、一つの面から他の面へ細孔サイズが均一なものである。リボソームの目的とする平均粒径が約200nm未満である場合は、フィルターの好ましい細孔サイズは約100nm未満である。これらのフィルターは、好ましい分岐細孔型構造のものである。これらの酸化アルミニウムフィルターは、短寿命である。即ち、それらは、水性溶液中で劣化せず、良好な耐有機溶媒性を有し、高透過性を促進する均一なサイズの細孔を有

している。このようなフィルムの性質のために、比較的低圧下にて、比較的薄流量で、リボソームをフィルムから押し出せることが出来た（下記実施例3参照）。このように、酸化アルミニウムフィルターは、従来知られているポリマーのフィルターよりも、リボソームを押し出すのに優れていることがわかる。

本発明においては、リボソームが小さいサイズの細孔を有する面に入り、大きいサイズの細孔を有する面から出るように、分岐細孔フィルターを用いるのが好ましい。しかし、下記実施例4に示すごとく、リボソームが大きい細孔サイズの面に入るような逆の位置にフィルターを接続した場合でも、良好な押出を導くことが出来る。

本発明の方法によれば、一部の粒径が所定の最大粒径よりも大きいリボソームの懸濁液から、所定の最大粒径よりも大きいリボソームを實質的に含まないリボソーム懸濁液が製造される。この方法は、上記タイプの一つのような、酸化アルミニウム多孔性フィルムに、リボソームの懸濁液を、加圧で1mm以上通すことを含む。

リボソームの無菌が、“濾過の最大粒径よりも大きいリボソームを實質的に含まない”かどうかを測定するためには、標準サイザーを用いて、リボソームをサストすることが出来る。このような一つのサイザーは、Malvern Instruments, Malvern, England から入手できるモルバーンサイザー (Malvern Sizer) であり、それは、下記実施例のいくつかに記載され、使用されている。粒径分布を測定するのに用いることのできる他のサイザーは、Klue /Becke Instruments, Kent, Park, Ca から入手できるニコング (Niconp) (商標) レーザー粒子サイザーであり、これも、下記

実施例のいくつかに記載され、使用されている。下記実施例で提供されている粒径分布においては、テスト結果が、集団中に存在するリボソームの、9パーセントが所定の粒径より大きいことを示す場合は、集団がこのような大きい粒径のリボソームを“實質的に含まない”ことを示す。

必要ではないが、リボソームの懸液、特に粒径分布を、第一工程として、より大きいフィルターから押し出すことにより、より小さく、より均一にすることもできる。例えば、当該技術に示いてよく知られているように、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) から作られたフィルターのような、サイズが2〜10マイクロメートルの通常のフィルターからリボソームを押し出すば、酸化アルミニウムフィルターから押し出す前に、粒径及び粒径分布が小さくなり、それにより、押出の時間を低減させることができる。

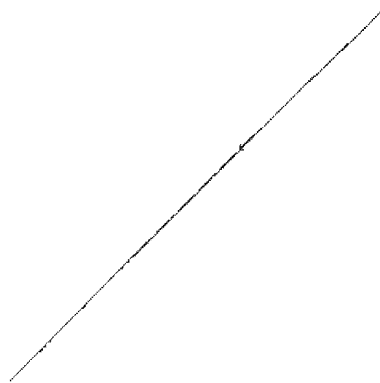
押出中の圧力は、用いられるリボソーム、その平均粒径及び粒径分布並びに目的とする流量によって異なってくる。押出圧力は、約200〜約1000psi (1, 4〜6, 0MPa) の範囲で変動するが、約500psi (4, 2MPa) 未満の圧力が好ましい。

一般に、本発明の分岐細孔型酸化アルミニウムフィルターを用いる場合、従来知られているポリカーボネートフィルターに對し、粒径、粒径分布及び流量に関して同様な結果を得るものが必要とする押出回数が少なくなる。しかし、より狭い粒径分布を得るために、特に、全てのリボソームを所定の最大粒径よりも小さくするために、酸化アルミニウムフィルターからの押出を繰り返してもよい。例えば、懸濁液を長くして、速く、有効で安価な方

法で、高性能の比較的均一なリボソームを製造するには、リボソームをフィルターから2〜10mm押し出すのが好ましい。多数回の押出により、多量な微小胞を、より好ましいオリゴヌクレオチド単量体形態に変えることもできる。

本発明の押出法に於いて、透析又は透析器通 (ダイヤリフトレーション) により、比較的均一な粒径の安定な高純カプセル化リボソームを造して、透析のカプセル化されなかった治験液又はその他の溶液を容易に除去することができる。得られたリボソームは、容易に計量され、非経口又は経口で投与するための均一な用量とすることができる。

本発明を次の実施例により更に説明するが、ここに記載されたものに本発明を限定するものではない。



## 特表平6-501646 (6)

## 実施例 1

## リボソームの調製

3 バッチのリボソーム (型下 A, B, C で表わす) を次のようにして調製した。

卵ホスファチジルコリン (Princeton Lipids, Princeton, New Jersey から取得) 7 l, 3 mg/ml 及びコレステロール (J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey) 28, 7 mg/ml を 0, 15 ~ 0, 5 m l の塩化メチレンに溶解し, 300 ml クエン酸緩衝液 (pH 4, 0) に加えて, 1 m l の容積にした。混合物を約 40°C に加熱して, 塩化メチレンを除去した。残留の液体を遠達するために, バッチ A 及び B には遠達を通したが, バッチ C は部分真空下で加熱した。

得られたリボソームは, 種々の粒径及び種々の粒径分布の小球であった。粉砕前のこれらのリボソームの最初の粒径分布を, Malvern Instruments, Malvern, England から入手できる, 8.3 m m のレンズを有するモールドバースサイザー 3600 E 型で測定した。結果を表 1 に示す。表 1 において, 平均粒径及び粒径分布範囲は, マイクロメートル (μm) で表わされる。押出前に, バッチ B も, 細孔サイズが 0.5 μm のミテックス (Mitex) (商標) P テフエフィルター (Millipore Corp., Bedford, Mass.) によりプレサイズ (予備分級) した。プレサイジング後のバッチ B のリボソームについての平均粒径及び分布範囲が, 表 1 に含まれている。バッチ A 及び C は, プレサイジングに通されなかった。この結果は, サイゼしていないリボソームの粒径分布において, かなりのバッチ対バッチ (batch-to-batch) 変動を示している。

## 表 1

## 押出前のリボソーム状態

バッチ	平均粒径 (μm)	分布範囲 (μm)
A	23.2	1.5-118
B	14.8	1.5-118
C	2.5	<1.2-5
C	3.3	<1.2-14

※ 5 マイクロメートル プレサイジング後

## 実施例 2

## リボソームの押出

実施例 1 により, 実施例 1 のリボソームを, 上記タイプの直径 9.0 m m, 細孔サイズ 1.00 μm (小さい細孔) のアノポア (商標) 分級細孔酸化アルミニウムフィルターに通して, 加圧下で 5 回押し出した。バッチ A 及び B についてのフィルターの配置は, 小さい細孔の断面を渡して投入されるものであった。大きい細孔を通して投入されるように, フィルターを逆にした状態で押し出した。バッチ C についても, 同様な結果が得られた。表示した回数だけフィルターに通した後, リボソームの平均粒径及びリボソームの粒径分布を測定した。粒径分布は, Hiac/Tecno Instruments, Menlo Park, Ca から入手できるニコンプ (商標) をゲル permeation chromatography サイザー (商標) で測定した。各押出後に測定した結果を, 表 2 にまとめる。

## 表 2

## 各押出後の平均粒径及び分布範囲

圧力 (PSI)(MPa)	押出量 (liters/min)	平均粒径 (μm)	<0.1 μm (%)	0.1- 0.45 μm (%)	>0.45 μm (%)
バッチ A:					
325(2.2)	NT	NT	NT	NT	NT
	0.2	0.182	2.6	84.4	3.0
	0.2	0.168	5.2	82.6	6.8
	0.2	0.132	7.6	92.3	0.0
	0.2	0.123	8.6	98.4	0.0
バッチ B:					
500(3.4)	0.02	0.150	19.1	78.6	2.2
交換フィルター					
300(2.1)	1.1	0.138	6.4	73.7	0.3
	1.2	0.153	20.2	79.2	0.0
	1.5	0.126	35.1	64.6	0.0
	1.5	0.115	35.1	63.9	0.0
バッチ C:					
逆フィルター					
300(2.1)	0.7	0.685	0.0	48.3	50.6
	0.7	0.162	23.2	76.2	0.6
	0.7	0.143	25.5	73.3	0.1
	0.3	0.149	22.5	77.5	0.0
325(2.2)	0.3	0.144	23.6	76.2	0.0
NT = テストせず					

## 比較例

比較のために, 実施例 1 のバッチ C で調整したリボソームのサンプルを, 最初の 5 回は直径 9.0 m m, 細孔サイズ 2.00 μm のスクレボア (商標) ポリカーボネートフィルターに通し, 2 回目は 1.00 μm のスクレボア (商標) フィルターに通し, 1 回目は 2.00 μm の炭素フィルターに通して, 合計 8 回押し出した (スクレボア (商標) フィルターは, Nuclease, Inc., Pleasanton, Ca から市販されている)。本発明により, 第二のサンプルを, 直径 9.0 m m, 細孔サイズ 1.00 μm のアノポア (商標) フィルターに 4 回通して押し出した。第一のサンプルの場合と同様に, このサンプルを 2.00 μm の炭素フィルターに通した。第 1 回に示した押出回数後に, 粒径データを測定した。全ての押出は, 400 psi (2, 3 MPa) の同一圧力で行われた。結果を表 3 に示す。

表 III  
押出後の粒径分布及び粒度分布

吐出量				0.1- 0.45 $\mu$ m		
押出 回数	圧力 PSI(MPa)	吐出量 (liters/ min)	平均直径 ( $\mu$ m)	<0.1 $\mu$ m (%)	0.1-0.45 $\mu$ m (%)	>0.45 $\mu$ m (%)
サンプル 1:						
200 $\mu$ m スクレープ						
3	400(2.7)	0.7	0.105	2.5	89.1	1.4
100 $\mu$ m スクレープ						
6	400	0.3	0.168	13.5	86.3	0.3
7	400	0.3	NT	NT	NT	NT
220 $\mu$ m 篩網フィルター						
8	NT	NT	0.152	5.0	86.1	0.9
サンプル 2:						
100 $\mu$ m アノボア						
2	400(2.8)	0.7	0.174	22.0	78.0	1.1
4	400	0.8	0.146	17.8	82.5	0.0
220 $\mu$ m 篩網フィルター						
5	NT	NT	0.150	12.0	88.0	0.0

NT=テスト中

本発明の分粒細孔型酸化アルミニウムフィルターは、同様の粒

表 IV  
押出後の平均直径及び粒度分布

吐出量				0.1-		
押出	圧力 (liters)	平均直径	<0.1 $\mu$ m	0.1 $\mu$ m	>0.1 $\mu$ m	
回数	PSI(MPa)	(mm)	(%)	(%)	(%)	
<hr/>						
部分 1 (アノボア) (100 $\mu$ m フィルター) :						
1	200(2.1)	0.0	0.565	0.0	38.8	61.4
2	300	0.7	0.212	10.3	89.8	3.7
3	200	0.8	0.126	10.3	89.7	0.3
4	300	0.9	0.172	3.6	96.4	0.0
5	500	0.0	0.165	10.7	89.3	0.0
<hr/>						
部分 2 (スクレープ) (100 $\mu$ m フィルター) :						
1	300(2.1)- 500(3.4)	0.02	1.390	0.0	17.6	82.4
2	200(2.9)	0.2	0.213	11.2	84.0	4.0
3	200	0.3	0.178	8.9	93.3	0.3
4	200	0.3	0.167	7.4	92.6	0.0
5	200	0.3	0.138	58.1	86.5	0.0

5-6% 増進後、圧力を 100 から 500 psi に上昇

これらのデータは、両フィルターが、同一押出回数で同様な粒

特表平6-501646 (7)

径分布を得るのに、ポリカーボネートフィルターよりも高い流量で、必要とする押出回数が少ない。

#### 実施例 3

分粒細孔型酸化酸化アルミニウムフィルムの粉砕能力を、同様の粒径サイズのポリカーボネートフィルターと比較するために、溶解のテストを行なった。実施例 1 により作られたポリスフチジルコリンとコレステロールのリボソームを用い、100mg/ml のリボソーム水溶液で、テストを行なった。この実施例では、コレステロールを (Frodo Chemicals, New York, New York) から取得した。モルバレンサイダーで測定した最初の粒度分布は、中位径が 3.0, 8.0 $\mu$ m、直径範囲が 2, 4-11.8 $\mu$ m であった。サブミクロン粉砕を促進するために、100psi (0.7MPa) の圧力で、バッチを 500ml のマイクサックス (商標) の 25 $\mu$ m フィルターに 2 回通して処理した。この処理後、リボソームの粒度分布は、3, 8.0 $\mu$ m と測定され、直径の範囲は、1, 0-11.1 $\mu$ m であった。

このバッチを 2 つの部分に分断した。部分番号 1 を 0.1 マイクロメートルのアノボア (商標) フィルターに通して、押し出し、部分 2 を 0.1 マイクロメートルのスクレープ (商標) ポリカーボネートフィルターに通して、押し出した。両部分についての最初の粒度分布は、300psi (2.1MPa) であった。押出流量、粒度及び粒度分布を、フィルターに通す前に測定した。各部分について、合計 5 回の押出を行なった。結果を表 IV に示す。

径分布を与えることができることを示している。しかし、第一の部分に用いられた酸化アルミニウムフィルターは、第二の部分に用いられたポリカーボネートフィルターよりも、圧力が低くてもよく、はるかに高い流量で操作された。酸化アルミニウムフィルターを通す全ての押出は、300psi (2.1MPa) の圧力、0.6-0.8 リットル/分の流量で行なわれた。ポリカーボネートフィルターを用いて押出を繰り返した場合は、0.02 リットル/分という非常に低い流量で、フィルターでの最初の押出を完了させるだけでも、初期圧力を 300psi (2.1MPa) から 500psi (3.4MPa) に高める必要があった。2-5 回の押出では、0.2-0.3 リットル/分の流量を維持するために、700psi (4.8MPa) という高圧力が必要であった。

#### 実施例 4

リボソームを粉砕するために用いられる 100 $\mu$ m のアノボア (商標) 分粒細孔フィルターの場合に關して、リボソームの押出特性の差異を検討するために、更にテストを行なった。上で同じように、アノボア (商標) の 100 $\mu$ m 分粒細孔フィルターは、100mg/ml の細孔を有する小さい細孔の側と、200mg/ml の細孔を有する大きい細孔の側とを有している。このテストでは、小さい細孔の側を上流にするかあるいは大きい細孔の側を上流にした 100 $\mu$ m アノボア (商標) フィルターに、同一リボソーム物質の一部を逐次処理を求めたために、比較を行なった。

実施例 1 により作られたポリスフチジルコリンとコレステロールのリボソームを用い、100mg/ml のリボソーム水溶液で、テストを行なった。この物質は、5 リットルの単一ロッ



トで加圧し、よく混合して、4つの750mlサンプル(A-D)に分割した。サンプルA、Bは、1000nmを上流に向けたものを用いて押し出し、サンプルC、Dは、200nmを上流に向けたものを用いた。リボソームの吐出は、400kPa(4.9MPa)の圧力で、リボソームを分岐型フィルターに2回通することにより行なわれた。

各テストサンプルから通過された物質の粒径分布を、実施例2に述べたように、ニコフ(両部)サイザーを使用して測定し、一般に、等価であることがわかった。しかし、リボソームを粉砕するのに要する時間は、200nmフィルター側を上流としたサンプルC、Dとは反対に、1000nmフィルター側を上流としたサンプルA、Bでは、著しく短かった。表Vは、平均粒径をナノメートル(nm)で、通過時間を分(min)で示す。

表V

フィルター方向による平均粒径と吐出量

サンプル	平均粒径 (nm)			通過時間 (min)	
	開始	1回目	2回目	1回目	2回目
A	199	132	135	0.03	0.25
B	195	131	121	0.52	0.53
C	198	157	138	4.83	1.00
D	196	109	153	3.08	0.97

表いで、比較例で用いたものと同じタイプの200nm膜面フ

半分が膜面フィルターを通過することができただけで流れが止まってしまった。

実施例5

第1図は、本発明の特定の実施例により作られ、直径が40mmのアンボア(商標)フィルターに使用するために設計されたフィルター-集束装置(10)の、鉛直に作られた簡略化した平面図である。このフィルター-集束装置は、例えば、上記実施例1における比較テストに用いられ、スクレボア(商標)フィルターのような、他のタイプのフィルターを保持するのに使用できるものと認識されるべきである。第2図は、第1図の線B-Bに沿って切断されたフィルター-集束装置(10)の、断面に作られた簡略化した断面図である。フィルター-集束装置(10)は、フィルターハウジング上半部(11)とフィルターハウジング下半部(12)とからなり、産業の標準ネジ(13)で互いに固定されている。第2図において、フィルターユニット(14)は、90mmに切断されたドレインディスク(スクレボアのカタログは231700)上に取付けられた40mmのアンボアフィルターを示し、そのドレインディスクは、90mmのチタロン(登録商標)縦溝メッシュフィルターサポート(スクレボアのカタログは230054)上に、順次取付けられている。フィルターユニット(14)は、横チャンネル(transverse channel)(16)などの液体通過手段を備えたステンレス鋼フィルター-支持板(15)の上に、順次取付けられている。支持板(15)は、フィルターハウジング下半部(12)の底部(17)内に設置しており、この底部(17)には、フィルターを通過して、排出出口(18)へ通過する液体を導くための設計された溝(図示せず)が設けられている。

## 特表平6-501646 (8)

フィルターで、押し出された物質を通過させた。このテスト及び上記比較例で用いた膜面フィルターは、Milligore Corp., Bedford, Mass. により供給され、デューボア(Duopore)(商標)ポリビニリデンフルオライド(PVDF)膜性膜を有するといわれる。膜のミリパック(Millipack)(商標)200フィルターであった。全ての物質が膜面フィルターを通過したとき、又は物質の定常流が断れて、ゆっくり減速するようになったとき、膜面通過が完了したものとした。平均粒径(nm)、フィルターを通過するのに要する時間(min)及び膜面フィルターを通過した物質の容積パーセントを、各サンプルについて測定した。その結果を表VIに示す。

表VI

吐出フィルター方向がその後の膜面通過に与える影響

サンプル	平均粒径 (nm)	通過時間 (min)	フィルター透過 パーセント
A	133	2.67	96%
B	126	0.68	100%
C	151	2.95	47%
D	150	1.27	44%

これらのデータは、ほとんど全ての物質がうまく膜面フィルターを通過したサンプルA、Bの膜面通過が、非常に有効であったことを示している。これに対して、サンプルC、Dは、容積の利

フィルターハウジング上半部(11)は、上半部(11)を下半部(12)上にネジ(13)で締め付ける際に、フィルターユニット(14)を正しい位置に保持するリング部(19)を有している。

操作に際しては、通過すべき液体が、液体入口(20)からフィルター-集束装置(10)へ入り、フィルターユニット(14)及びフィルター-支持板(15)を通過して流れ、次いでフィルター出口(18)から外へ導かれる。ハウジング上半部(11)は、完全密閉(21)を備えていることが好ましく、それにより完全非(図示せず)をハウジングに取り付けることができる。

フィルター-集束装置(10)を“上半部”及び“下半部”で説明してしたが、これらの単語は、構造を説明する目的のためのものであり、操作時のハウジングの方向を示すものではない。通過される液体は、このような比較的弱い圧力で膜面装置に送られるので、膜面装置は、任意の方向で使用できると信じられている。

第3図は、本発明により作られた圧縮系の機構図である。流体しようとするリボソーム組成物は、高圧供給管(31)内に入り、流体は、同様な受容器(32)に集められる。これらの容器は、両方とも、リボソーム混合液を維持するために循環器を備えているものとして示されており、温度制御のために熱交換器が設けられている。流体は、供給出口から供給管路(33)を出て、90mmのアンボア(商標)フィルターを含む上記タイプの一つ又はそれ以上のフィルター-集束装置(34)を通過して運ばれる。フィルター-集束装置(34)は平行に接続されており、そのような集束装置の使用数は、供給管路(31)から受容器(32)への目的とする合計流量によって決まる。流体

特表平6-501646 (9)

は、受容容器(32)から、上記図面図1で述べたミキサバツタ(尚称)20のフィルターのような表面フィルター(33)に強制的に通され、次いで視座されている保持容器(34)に溜められる。更に、受容容器(32)から出てくるものの一部を供給管路(31)へ再循環させるために、再循環ライン(34)を設けてもよい。

用いられている用部及び箇所は、既得の周知として使用されているものであって、既定するものではない。このような用部及び箇所の使用には、係され、記載された特徴の必要ないもの一様を形成する意図はなく、請求された発明の範囲内では、種々の変更が可能であると認められる。

図 1 (82)

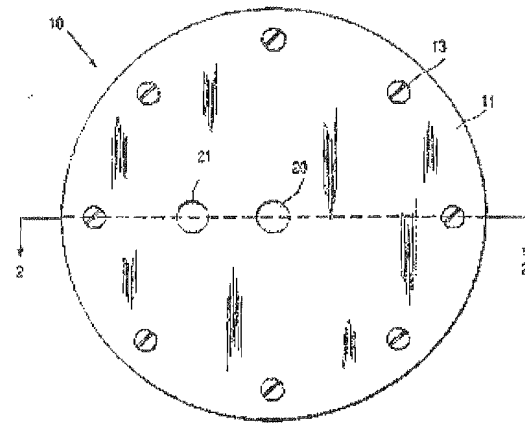


図 2 (83)

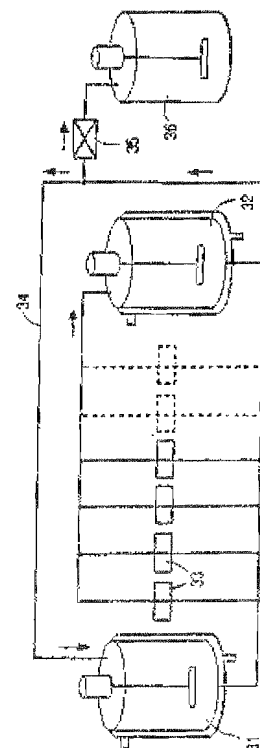
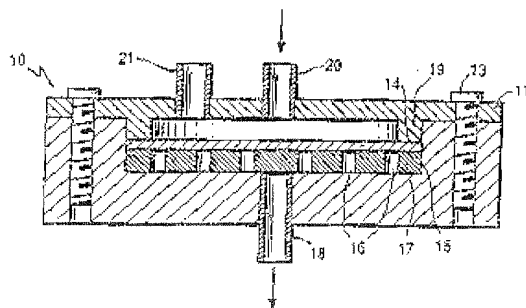


図 3 (84)



特 許 平 6-501646 (11)

フロントページの続き

(72)発明者 ティエス、ロバート、エル  
 カナダ国 ブリティッシュコロンビア州  
 ヴィ6アール 3エム8 ヴァンクーバー  
 ダンバーストリート 224 1

(72)発明者 ポートノッフ、ジョエル、ビー  
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州  
 18954 リッチボロ グレゴリイブレース  
 76

特表平6-501646

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成11年(1999)6月8日

【公表番号】特表平6-501646

【公表日】平成6年(1994)2月24日

【年号号数】

【出願番号】特願平3-518543

【国際特許分類第6版】

A61K 9/127

B01J 13/02

【F I】

A61K 9/127 C

B01J 13/02 Z

## 本公報更正

平成11年5月15日

特許庁長官 中

1. 更正の理由

特許法第17条第1項及び第2項

2. 更正の範囲

特許法第17条第1項

3. 更正の事項

特許法第17条第1項

4. 更正の趣旨

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

5. 更正の趣旨

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

## 本公報の訂正

特許法第17条第1項

## 訂正の趣旨

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

特許法第17条第1項

待衰平 6-501646

南京人民

1. 標本の採集場所は、大分県中津市下津の河川敷である。

3. 徐西純と明葉の間に 2 次

（注）この金額は、調査中に4回以上、お風呂に入浴したと答へた男女の平均値に算出された。

したがって、この最終項目を既述の「 $\alpha$ 」に等しい性質「 $\beta$ 」とする。

「この山は山に山といふ感じがある。ヒマラヤに匹敵する。」

- ・ 以上の場合、内部に整音がなく、いとえの連発

目と顔など、全身の動きは顔面に合わせたのではないように、手  
 先の動きで顔が、手先の顔の動きを決定している。

● 全國經濟發展委員會、  
● 全國經濟發展委員會、

7. 與田原を越ゆる  $\phi(u)$  (4) の解を  $x$  の  $u$  よりも小さい所まで

1. 研究費額の増減状態とそれによる研究費の充てられ方、その

[illegible]

而由于对费正清的评价存在分歧，所以美国国内对费正清的评价存在分歧。费正清在美国学术界和政界都享有盛誉，但在中国学术界和政界则存在不同的评价。费正清在美国学术界和政界都享有盛誉，但在中国学术界和政界则存在不同的评价。

[illegible]

このようにして、 $\mathcal{H}$  の基底を  $\{e_1, e_2, \dots, e_n\}$  とし、 $\mathcal{H}$  の任意のベクトル  $x$  を  $x = x_1 e_1 + x_2 e_2 + \dots + x_n e_n$  と表すことができる。このとき、 $x$  のノルムは、 $\|x\| = \sqrt{x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_n^2}$  と表すことができる。

而，（五）討論報告中，以「臺灣的經濟發展」為主題，另也提到教育與「社會」的關係，又有一張空紙置。

（四）由于这一类毒品最初在加拿大生产，所以一般认为加拿大是这一类毒品的主要供应国，也是这一类毒品的主要消费国。

[illegible][illegible]

以上の説は、その一側面を論ずる論者の論議に止れるので、  
 更に、海産を主とする陸産から陸産を主とする海産とする内閣閣議を

とびに合つては、その幾何学的な式。